doi:10.13866/j.azr.2019.02.20

新疆野苹果果实总 RNA 提取方法的筛选①

夏春兰[1,2,3]， 闻志彬[1]， 张玉芳[1]
（1. 中国科学院新疆生态与地理研究所，中国科学院干旱区生物地理与生物资源重点实验室，新疆 乌鲁木齐 830000；2. 中国科学院大学，北京 101408；3. 石河子大学生命科学学院，新疆 石河子 832000）

摘 要：由于新疆野苹果（*Malus sieversii*）果实富含多糖、多酚、可溶性果胶及其他次生代谢物质，导致果实的总 RNA 提取相对比较困难，质量较差。因此，本试验以不同发育时期的新疆野苹果的果实为材料，采用 TaKaRa 试剂盒、全氏金试剂盒、田伟等改良的 CTAB 法、本试验改良的 CTAB 法（一）和 CTAB 法（二）这 5 种方法来摸索提取野苹果果实的总 RNA 的有效方法。结果表明：2 种试剂盒均无法从野苹果果实中提取出 RNA；通过 3 种改良 CTAB 法提取的 RNA，在琼脂糖凝胶上得到清晰的 28S 和 18S 条带，并且纯度均较高，OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8～2.2 之间、OD_{260}/OD_{230} 值大于 2.0。但是只有本试验改良 CTAB 法（一）获得较高的 RNA 产量，从 5 个不同发育时期的野苹果果实中提取的 RNA 平均值在 116.79～474.76 μg·g^{-1}。改良 CTAB 法（一）通过延长 LiCl 沉淀时间，将 −20 ℃ 放置 15 min 改为 4 ℃ 放置过夜（时间不超过 16 h），可以有效地除去 RNA 中的杂质污染，使得 RNA 充分沉淀。这种改良方法耗时相对较长，需要 2 d，但是方法易于操作且提取成本较低。因此，改良 CTAB 法（一）是适用于提取野苹果果实（尤其是发育晚期）总 RNA 的有效方法，完全可以满足后期的分子生物学试验所需。

关键词：新疆野苹果（*Malus sieversii*）；总 RNA；提取方法；改良 CTAB 法

新疆野苹果，又称塞威士苹果（*Malus sieversii*），属于第三纪孑遗物种[1]，是现代人工栽培苹果的直系祖先，是中国经济果树资源中惟一的天然基因库，也是世界野苹果基因库的重要组成部分[2-3]。因此新疆野苹果作为研究材料具有重要研究价值。

RNA 的质量将直接影响 cDNA 合成、基因克隆、基因表达分析和功能基因筛选等后续研究的成败[4]。从野苹果果实中获取高质量 RNA 是对野苹果果实生长发育和代谢等相关基因进行分子生物学研究的重要基础。野苹果果实富含多酚、多糖类物质及其他次生代谢产物，这加大了 RNA 提取的难度[5-6]，而且在野苹果成熟后期，RNA 降解的趋势大于合成，RNA 的提取更加困难[4]。此外，各种市售的 RNA 提取试剂盒并未针对野苹果果实 RNA 的提取质量做统一对比。

目前，对于植物果实 RNA 的提取，CTAB 法的应用更为广泛，并且相较于试剂盒有更好的提取效果[7]。文献〔8〕的改良 CTAB 法是对经典 CTAB 法进行了适当改良，并取得比经典 CTAB 法更好的 RNA 提取效果。改良 CTAB 法是在 CTAB 提取缓冲液中加入一些还原剂，如 β－巯基乙醇来避免褐化物质对 RNA 的影响[9]；用氯仿－异戊醇来抽提可以进一步使蛋白质变性分层并去除脂类[10]；用低温预冷的无水乙醇来沉淀 RNA[11]。田伟等[12]和杜凡等[13]各自对 CTAB 法进行了改良，在提取苹果茎尖和叶片等组织的 RNA 时得到了很好的效果，提取值大约是 680.5 μg·g^{-1}。他们都利用了 LiCl 来初次沉淀 RNA，然后再利用低温预冷的无水乙醇沉淀 RNA。使用 LiCl 和无水乙醇来沉淀 RNA 比单独使用无水乙醇沉淀 RNA 的效果要好[14]。宋成秀等[15]利用改良的 CTAB 法提取了野苹果果实总 RNA，该试验只用了无水乙醇来沉淀 RNA，提取出的 RNA 质量并不是很高，在 46.2～54.3 μg·g^{-1}。此外，该试验还对比了 RNeasy plant Mini kit、EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒、RNA pure plant plus reagent 复杂植物总 RNA 提取试剂盒这 3 种试剂盒方法，但提取效果都不如改良 CTAB 法，3 种试剂盒方法提取的总 RNA 产量在 1.5～15.0 μg·g^{-1}。

① **收稿日期**：2018－04－24； **修订日期**：2018－08－30
基金项目：国家重点研发计划（2016YFC0501505）；中国科学院特色研究所主要服务项目（TSS－2015－014－FW－4－3）
作者简介：夏春兰（1996－），女，在读硕士生，专业方向为生物科学
通讯作者：闻志彬．E-mail：zhibinwen@ms.xjb.ac.cn

本研究以不同发育时期野苹果果实为材料，采用 TaKaRa 试剂盒、全氏金试剂盒、田伟等改良的 CTAB 法以及在田伟和杜凡等基础上本试验改良的 CTAB 法(一)和 CTAB 法(二)这 5 种方法对野苹果果实 RNA 进行提取。在此基础上，希望找到一种在不同发育期野苹果果实中能获得高质量 RNA 的提取方法，以便后续开展野苹果果实分子生物学的深入研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验所用植物材料为新疆野苹果果实。苹果样品均采自新疆伊犁自治州巩留县野果林。依据苹果生长过程的 5 个关键时期[16]，包括细胞分裂期、细胞膨大期、淀粉积累期、可溶性固体积累期、淀粉降解期。试验分别于 6 月 17 日(盛花期后 23 d)、7 月 4 日(盛花期后 40 d)、7 月 28 日(盛花期后 64 d)、8 月 28 日(盛花期后 94 d)、9 月 28 日(盛花期后 124 d)进行了 5 次采样(图 1)。每次 12:00 选取树冠西侧充分照光的果实，取 15 个果实迅速去籽后，将果实切块于液氮中速冻，保存于 –80 ℃备用。每次取样均有 5 组生物学重复，并且每个样品单独提取 RNA 2 次。

1.2 RNA 提取方法

1.2.1 试剂盒法 分别用购自 TaKaRa 公司的 RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 试剂盒(9752A)和全氏金生物技术有限公司的 TransZol Plant 试剂盒(ET121)按照说明书步骤要求进行 RNA 提取，这 2 种试剂盒方法耗时很短，提取一个样品的 RNA 仅需要 1 h。

1.2.2 田伟等改良的 CTAB 法 田伟等[12]在 CTAB 法的基础上作出了适当的改进，具体方法如下：① 称取苹果茎尖或其他组织约 0.1 g，在液氮中研成细粉，快速转入含 850 μL 预先在 65 ℃预热的提取液〔3% 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)；100 mmol · L^{-1} Tris – HCl，pH 8.0；25 mmol · L^{-1}乙二胺四乙酸(EDTA)，pH 8.0；2 mol · L^{-1} NaCl〕；用前加入 2% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 4% β – 巯基乙醇的 2 mL 离心管中，漩涡振荡 2 min，在 65 ℃水浴中保温 10 min；② 将离心管取出，加入等体积氯仿：异戊醇(24:1)(V/V)，漩涡振荡混匀，4 ℃，12 000 r · min^{-1}离心 10 min；③ 转移上清液至新的离心管中，重复步骤②；④ 将上清液转移至另一新的离心管中，加入 1/3 体积 8 mol · L^{-1} LiCl，–20 ℃放置 15 min；4 ℃，12 000 r · min^{-1}离心 10 min，弃上清液，得到沉于离心管底部的 RNA；⑤ 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次，室温下干燥；⑥ 用 100 μL DEPC – H_2O 溶解 RNA，加入 1/10 体积 3 mol · L^{-1} NaAc (pH 5.2)和 2.5 倍体积无水乙醇，–20 ℃放置 15 min；⑦ 4 ℃，12 000 r · min^{-1}离心 10 min，弃上清液；⑧ 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次，室温下干燥，将沉淀溶于 30 μL DEPC – H_2O 中，–80 ℃冻存。该方法总共耗时 4 ~ 5 h。

1.2.3 改良的 CTAB 法(一) 结合李冬霞[17]改良的 CTAB 法，本试验对田伟等改良的 CTAB 法作了改动，将 1.2.2 步骤④中 –20 ℃放置 15 min 改为 4 ℃放置过夜(时间不超过 16 h)，其余步骤不变。该方法总共耗时 2 d。

1.2.4 改良的 CTAB 法(二) 结合杜凡[13]改良的 CTAB 法，本试验又进行了如下尝试：① 称取野苹果果实约 0.1 g，在液氮中研成细粉，快速转入含 850 μL 预先在 65 ℃预热的提取液 (3% CTAB；100 mmol · L^{-1} Tris – HCl，pH 8.0；25 mmol · L^{-1} EDTA，pH 8.0；2 mol · L^{-1} NaCl；用前加入 2% PVP 和 4% β – 巯基乙醇的 2 mL 离心管中，漩涡振荡 2 min，在 65 ℃水浴中保温 10 min；② 将离心管取出，加入等体积氯仿：异戊醇(24:1)和水饱和酚，漩涡振荡混匀，4 ℃，12 000 r · min^{-1}离心 5 min；③ 转移上清液至新的离心管中，重复步骤②；④ 将上清液转移



图 1 5 个不同发育时期的野苹果果实样品

Fig. 1 Samples of *Malus sieversii* fruits at five different developmental stages

至新的离心管中,加入 1/3 体积 8 mol · L^{-1} LiCl,4 ℃过夜沉淀(时间不超过 16 h),4 ℃,12 000 r · min^{-1}离心 20 min,弃上清液;⑤ 用 500 μL SSTE 缓冲液(1 mol · L^{-1} NaCl;0.5% SDS;10 mmol · L^{-1} Tris - HCl,pH 8.0;1 mmol · L^{-1} EDTA,pH 8.0)溶解沉淀,置于冰上;⑥ 用等体积氯仿:异戊醇(24:1)和水饱和酚提取,4 ℃,12 000 r · min^{-1}离心 5 min;⑦ 小心吸取上清,加 2 倍体积无水乙醇,-70 ℃放置 30 min;⑧ 4 ℃,1 2000 r · min^{-1}离心 20 min,弃上清液,用 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次,室温下干燥,将沉淀溶于 30 μL DEPC - H_2O 中,-80 ℃冻存。该方法共耗时 2 d。

1.3 RNA 完整性及质量检测

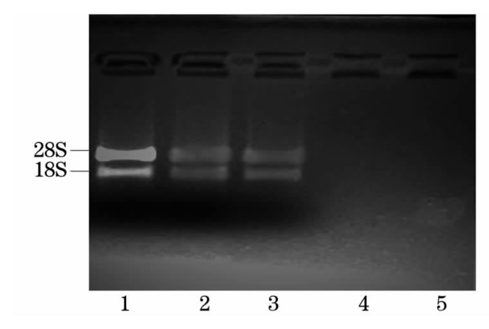
1.3.1 RNA 定量分析 用 Nanodrop - 2000 型核酸蛋白检测仪测定总 RNA 的浓度及纯度,测量其在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处的紫外吸光值(*OD*)。每种方法重复提取 3 次并分别测定,取平均值。根据 OD_{260}/OD_{280}、OD_{260}/OD_{230}的比值分析 *RNA* 纯度。当 OD_{260}/OD_{280} >1.8 时,计算 RNA 总产量:RNA 得率 = RNA 浓度(40 × OD_{260} × 稀释倍数) × 样品体积/样品质量。

1.3.2 RNA 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用紫外凝胶成像系统(型号为 Tanon - 2500R)观察其完整性。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取的总 RNA 完整性比较

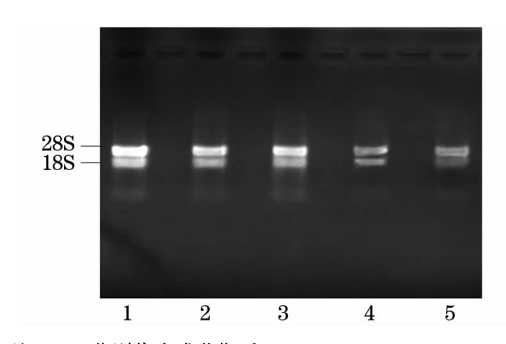
分别利用上述 5 种方法提取不同时期的野苹果果实总 RNA,所得到的凝胶电泳图的结果一致。通过凝胶电泳图可以初步判断提取的总 RNA 完整性以及是否有 DNA 和蛋白质污染。将 5 种提取方法所得的总 RNA 在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测,发现通过改良 CTAB 法(一)提取的 RNA 得到了比较完整并且清晰的条带,没有明显的弥散和 DNA 污染现象,28S rRNA 的亮度几乎是 18S rRNA 的 2 倍(图 2 - 1),说明 RNA 完整性较好,降解少。2 种试剂盒(全氏金和 TaKaRa)方法虽然耗时短,操作简便,但是均未能从野苹果果实中提取出完整的 RNA,很可能是提取过程中 RNA 降解过于严重造成的(图 2 - 4 和图 2 - 5)。本试验所改良的 CTAB 法(二)和田伟等改良的 CTAB 法虽然也能提取出果实的总 RNA,但是提取量不足以满足后期分子生物



注:1 ~ 5 分别代表改良 CTAB 法(一)、改良 CTAB 法(二)、田伟等改良的 CTAB 法、全氏金试剂盒和 TaKaRa 试剂盒。

图 2 5 种方法提取的野苹果果实总 RNA 的电泳图(以盛花期 23 d 后为例)

Fig. 2 Electrophoretic map of total RNA extracted from *M. sieversii* fruits using five methods (fruits after flowering for 23 days)



注:1 ~ 5 分别代表盛花期后 23 d、40 d、64 d、94 d、124 d。

图 3 改良 CTAB 法(一)提取不同发育时期野苹果果实的总 RNA

Fig. 3 Total RNA extracted with the improved CTAB method I from *M. sieversii* fruits at different developmental stages

学试验所需(图 2 - 2 和图 2 - 3)。而本试验改良的 CTAB 法(一)比较适合于提取野苹果果实总 RNA。

在此基础上,本试验利用改良 CTAB 法(一)提取了 5 个发育时期的野苹果果实总 RNA,结果如图 3 所示,5 个时期的样品均可以得到比较完整的 RNA,而且从果实发育初期到后期有明显的 RNA 降解现象,可能是由于发育后期的果实内部包括 RNA 酶在内的各种水解酶大量积累[18],同时多酚多糖的含量也随之增加导致 RNA 的提取更加困难,所以条带的亮度逐渐变暗。

2.2 不同方法提取总 RNA 的纯度和产量比较

将用 5 种方法提取的不同时期果实的 RNA 样品经 Nanodrop - 2000 型核酸蛋白检测仪检测,所得到的峰图的结果一致,如图 4 所示。只有 3 种 CTAB 法的检测图呈单峰。用 TaKaRa 试剂盒提取的 RNA,其 OD_{260}/OD_{280}值都大于 2.2,OD_{260}/OD_{230}值都

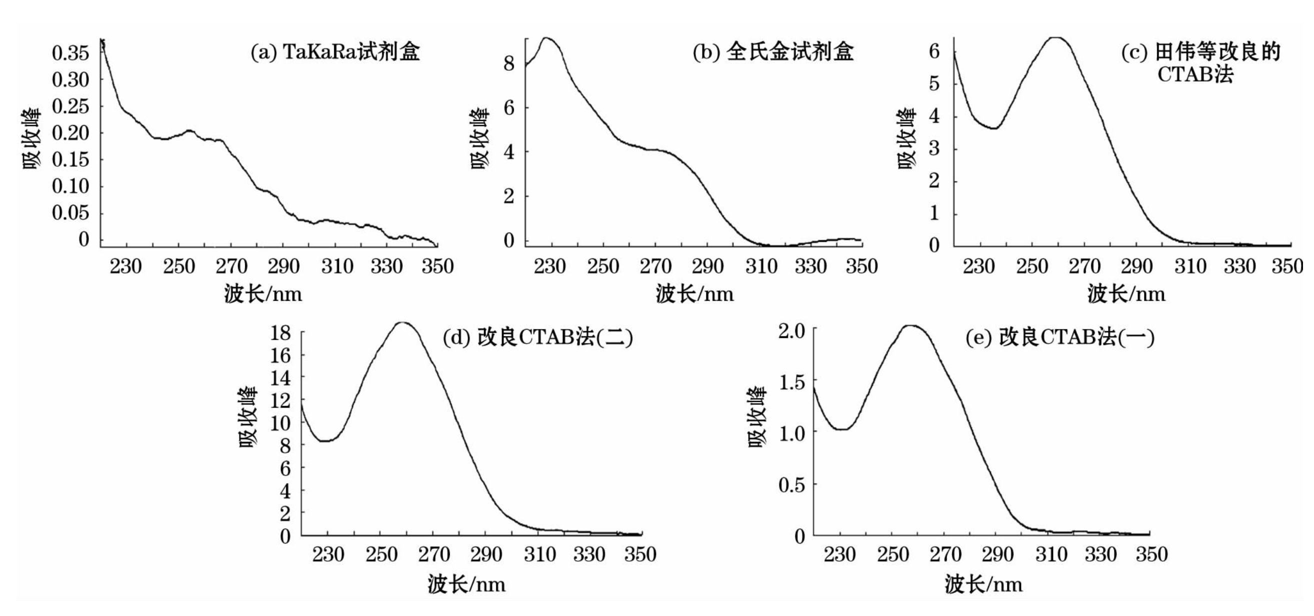


图4 不同提取方法得到的RNA浓度检测峰图(以盛花期23 d后为例)

Fig.4 Peak values of RNA concentration obtained by different extraction methods (fruits after flowering for 23 days)

小于2.0。通过全氏金试剂盒提取的RNA,其OD_{260}/OD_{280}值均小于1.8,OD_{260}/OD_{230}值均小于2.0。而田伟等改良的CTAB法以及本试验改良的CTAB法(一)、CTAB法(二)提取出来的总RNA经检测,其OD_{260}/OD_{280}值均在1.8~2.0之间,OD_{260}/OD_{230}值基本都大于2.0。其中改良CTAB法(一)提取出的RNA产量最高(表1)。从5个不同发育时期的野苹果果实中提取的RNA平均值在116.79~474.76 μg·g^{-1}。因此,上述5种方法中,改良CTAB法(一)是最适合于从野苹果果实中获取高质量RNA的方法,虽然此法耗时2 d,但是提取效果非常好。即使是发育后期,果实总RNA降解非常严重以及多酚多糖等次生代谢产物大量积累的情况下[19],该方法也可以提取出较高质量、稳定性好的总RNA,以便于后期用于荧光定量PCR等分子生物学试验。

3 讨论与结论

3.1 讨论

获取高纯度和高浓度的总RNA是对野苹果进行后续qPCR、基因文库构建等分子生物学研究的基础。RNA的提取会受到诸多因素的影响。不同种类的植物以及同种植物的不同组织往往需要不同的RNA提取方法[20]。苹果(野苹果)果实提取出较高质量和浓度的RNA比较困难,原因在于苹果(野苹果)果实中含有大量的多酚、多糖、可溶性果胶以及其他次生代谢产物[21]。多糖的性质与RNA相似,在提取过程中易与RNA一起形成胶状沉淀,在后继试验中易与酶结合使酶失活,严重干扰试验的进行;酚类物质被氧化后形成醌类物质与RNA不可逆的结合,导致RNA活性丧失;果胶能够阻碍核酸的分离,大大降低RNA产率[22]。

本试验所用的2种试剂盒〔TaKaRa公司的RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue试剂盒(9752A)和全氏金生物技术有限公司的TransZol Plant试剂盒(ET121)〕提取野苹果果实的RNA效果不佳。用TaKaRa试剂盒提取的RNA,其OD_{260}/OD_{280}值都大于2.2,OD_{260}/OD_{230}值都小于2.0,说明RNA降解严重且含有大量杂质污染[12];提取出的RNA产量较低,从5个不同发育时期的野苹果果实中提取的RNA平均值在0.16~4.20 μg·g^{-1}(表1)。通过全氏金试剂盒提取的RNA,其OD_{260}/OD_{280}值均小于1.8,OD_{260}/OD_{230}值均小于2.0,表明提取的总RNA样品中蛋白质和糖类及多酚类物质污染明显[12];提取出的RNA产量极低,从5个不同发育时期的野苹果果实中提取的RNA平均值在12.45~63.9 μg·g^{-1}(表1)。

综合苹果RNA提取方法,CTAB法较为经典[23]。因此本试验采用了3种改良CTAB法来提取野苹果果实的总RNA。这3种CTAB法提取总RNA的OD_{260}/OD_{280}值均在1.8~2.0之间,OD_{260}/OD_{230}值基本都大于2.0(表1),表明RNA纯度较

表 1　5 种方法提取的不同发育时期的总 RNA 纯度及产量的比较

Tab. 1　Compared results of total RNA purity extracted by five methods and yield of *M. sieversii* fruits at different developmental stages

RNA 提取方法		OD_{260}/OD_{280} 值（平均值 ± 标准差）	OD_{260}/OD_{230} 值（平均值 ± 标准差）	产量/(μg · g^{-1})（平均值 ± 标准差）
TaKaRa 试剂盒	盛花期后 23 d	2.79 ±0.28	0.15 ±0.04	4.20 ±1.08
	盛花期后 40 d	2.23 ±0.11	0.31 ±0.06	1.14 ±0.04
	盛花期后 64 d	2.78 ±0.08	0.14 ±0.03	2.05 ±0.22
	盛花期后 94 d	2.45 ±0.21	0.04 ±0.01	2.71 ±0.14
	盛花期后 124 d	2.71 ±0.17	0.10 ±0.03	0.16 ±0.05
全氏金试剂盒	盛花期后 23 d	1.38 ±0.16	0.22 ±0.08	63.9 ±19.08
	盛花期后 40 d	1.41 ±0.25	0.19 ±0.06	50.8 ±10.04
	盛花期后 64 d	1.55 ±0.23	0.56 ±0.19	57.8 ±22.12
	盛花期后 94 d	1.04 ±0.15	0.28 ±0.08	24.12 ±9.14
	盛花期后 124 d	0.78 ±0.16	0.08 ±0.02	12.45 ±4.18
田伟等改良的 CTAB 法	盛花期后 23 d	1.96 ±0.05	2.03 ±0.03	78.63 ±19.71
	盛花期后 40 d	2.01 ±0.14	2.07 ±0.07	46.78 ±10.25
	盛花期后 64 d	1.98 ±0.08	2.11 ±0.09	34.59 ±8.79
	盛花期后 94 d	2.07 ±0.06	2.01 ±0.05	21.45 ±6.48
	盛花期后 124 d	1.94 ±0.07	2.11 ±0.11	11.74 ±3.09
改良 CTAB 法(一)	盛花期后 23 d	2.09 ±0.08	2.29 ±0.08	474.76 ±176.41
	盛花期后 40 d	2.11 ±0.07	2.18 ±0.07	268.29 ±91.50
	盛花期后 64 d	2.02 ±0.04	2.22 ±0.12	164.26 ±80.20
	盛花期后 94 d	2.12 ±0.08	2.05 ±0.06	126.53 ±44.30
	盛花期后 124 d	2.09 ±0.09	2.13 ±0.13	116.79 ±48.52
改良 CTAB 法(二)	盛花期后 23 d	1.99 ±0.11	2.01 ±0.04	24.45 ±7.74
	盛花期后 40 d	1.89 ±0.06	2.09 ±0.07	19.56 ±4.43
	盛花期后 64 d	2.01 ±0.15	2.01 ±0.03	11.45 ±5.08
	盛花期后 94 d	1.96 ±0.08	2.06 ±0.07	7.05 ±1.24
	盛花期后 124 d	2.04 ±0.12	2.15 ±0.13	7.56 ±2.55

高。田伟等[12]改良的 CTAB 法提取的 RNA 产量较低,从 5 个不同发育时期的野苹果果实中提取的 RNA 平均值在 11.74 ~78.63 μg · g^{-1}(表 1),该方法没有取得很好效果的原因可能是由于 LiCl 沉淀时间太短(-20 ℃放置 15 min),导致 RNA 没有充分沉淀下来。

改良 CTAB 法(一)是在田伟等[12]和李冬霞[17]改良的 CTAB 法的基础上,将 LiCl 沉淀 RNA 时间由 -20 ℃放置 15 min 改为 4 ℃放置过夜,这样可以有效地去除残余多酚多糖,进一步除去 RNA 中的 DNA 污染;同时过夜可以让 RNA 充分沉淀,但沉淀时长若超过 16 h,RNA 会严重降解,因此把握好这一过程的沉淀时间是能否提取出高质量总 RNA 的关键。改良 CTAB 法(一)提取的 RNA 质量和产量均较高。从 5 个不同发育时期的野苹果果实中提取的 RNA 平均值在 116.79 ~474.76 μg · g^{-1}(表 1)。

改良 CTAB 法(二)是结合了田伟等[12]和杜凡[13]改良的 CTAB 法,利用等体积氯仿: 异戊醇(24: 1)和水饱和酚进行抽提。此外,在 LiC1 过夜沉淀后利用 SSTE 缓冲液来溶解沉淀,再次用等体积氯仿: 异戊醇(24: 1)和水饱和酚进行抽提。水饱和酚在低 pH 的情况下能促进水相中的蛋白和 DNA 向有机相分配,从而最大限度的除去总 RNA 中的蛋白和 DNA,但是本方法提取野苹果果实 RNA 的产量并不佳。从 5 个不同发育时期的野苹果果实中提取的 RNA 平均值在 7.05 ~24.45 μg · g^{-1}(表 1)。

在野苹果果实总RNA的提取过程中，有几个关键问题需要注意：① 在液氮中保存的果实会变的异常坚硬，为避免空气中RNA酶的降解作用，必须将果实快速研磨至粉末；② 在抽提过程中，避免吸入上清层以外的下层溶液，以便减少杂质污染；③ 清洗沉淀后应使沉淀尽可能的完全干燥，因为残余的酒精里很可能含有盐、多糖等杂质，从而干扰后续的RNA纯度检测，但是干燥时间不宜过长，以免RNA降解。

3.2 结论

综上所述，本试验所用的2种试剂盒无法从野苹果果实中提出总RNA。虽然田伟等[12]改良的CTAB法和本试验改良的CTAB法（二）提出的RNA纯度较高，但产量偏低。本试验所用的改良CTAB法（一）提取的RNA质量和产量均较高。从5个不同发育时期的野苹果果实中提取的RNA平均值在116.79～474.76 μg · g^{-1}。虽然改良CTAB法（一）步骤比较繁琐，耗时2 d，但是方法易于操作且提取成本较低。因此，改良CTAB法（一）是对野苹果果实（尤其是晚期果实）进行RNA提取的首选方法。该方法的建立为野苹果分子生物学研究奠定了良好的技术基础，同时也对其他富含多酚多糖的植物材料的RNA提取有很好的借鉴意义。

参考文献（References）：

〔1〕 张艳敏，冯涛，张春雨，等. 新疆野苹果研究进展〔J〕. 园艺学报，2009，36(3)：447－452.〔Zhang Yanmin，Feng Tao，Zhang Chunyu，et al. Advances in research of the *Malus sieversii*（Lebed.）Roeml.〔J〕. Acta Horticulture Sinica，2009，36(3)：447－452.〕

〔2〕 宋益学. 新疆野苹果的管理现状和保护措施〔J〕. 新疆林业，2006，30(6)：34－35.〔Song Yixue. Management status and protection measures of *Malus sieversii*（Lebed.）Roeml.〔J〕. Xinjiang Forestry，2006，30(6)：34－35.〕

〔3〕 李宇秀，张宏祥. 死亡植株对新疆野苹果种群遗传多样性的影响〔J〕. 干旱区研究，2018，35(1)：165－170.〔Li Yuxiu，Zhang Hongxiang. Effect of death individual on the genetic diversity of *Malus sieversii* population〔J〕. Arid Zone Research，2018，35(1)：165－170.〕

〔4〕 姚玉新，赵玲玲，郝玉金，等. 改良热硼酸法高效提取苹果果实RNA〔J〕. 果树学报，2005，22(6)：141－144.〔Yao Yuxin，Zhao Linlin，Hao Yujin，et al. Effective extraction of total RNA in apple flesh with improved hot borate method〔J〕. Journal of Fruit Science，2005，22(6)：141－144.〕

〔5〕 李宏，王新力. 植物组织RNA提取的难点及对策〔J〕. 生物技术通报，1999，1(8)：38－41.〔Li Hong，Wang Xili. The difficulties in the isolation of RNA from plant tissues and their resolving strategies〔J〕. Biotechnology Bulletin，1999，1(8)：38－41.〕

〔6〕 刘芳，官春云. 富含多酚类植物RNA提取的研究进展〔J〕. 作物研究，2015，29(1)：91－95.〔Liu Fang，Guan Chunyun. Research progress on RNA extracting from plants rich in polyphenols〔J〕. Crop Research，2015，29(1)：91－95.〕

〔7〕 杨亮，付丽娅，刘仲齐，等. 富含多糖番茄果实组织中总RNA的有效提取方法〔J〕. 南开大学学报（自然科学版），2005，38(5)：36－39.〔Yang Liang，Fu Liya，Liu Zhongqi，et al. An effective method for extracting total RNA from tomato fruit tissue rich in polysaccharides〔J〕. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis，2005，38(5)：36－39.〕

〔8〕 郭秀莲，张正银，田萍，等. 杜鹃花叶片总RNA的改良CTAB法提取〔J〕. 时珍国医国药，2010，21(1)：29－31.〔Guo Xiulian，Zhang Zhengyin，Tian Ping，et al. Extraction of total RNA in Rhododendron leaf with improved CTAB method〔J〕. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research，2010，21(1)：29－31.〕

〔9〕 庄军平，苏箐，陈维信. 一种从香蕉果实提取高质量RNA的方法〔J〕. 分子植物育种，2006，4(1)：143－146.〔Zhuang Junping，Su Jing，Chen Weixin. An effective method for high-quality RNA isolation from banana fruit〔J〕. Molecular Plant Breeding，2006，4(1)：143－146.〕

〔10〕 张卿，刘帅，邢宇，等. 草莓果实总RNA提取方法的比较〔J〕. 中国农学通报，2015，31(31)：146－149.〔Zhang Qing，Liu Shuai，Xing Yu，et al. Comparison of extraction methods of total RNA from strawberry fruits〔J〕. Chinese Agricultural Science Bulletin，2015，31(31)：146－149.〕

〔11〕 Lewinsohn E，Steele C L，Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms〔J〕. Plant Molecular Biology Reporter，1994，37(12)：20－25.

〔12〕 田伟，田义轲，王彩虹，等. 苹果组织总RNA提取方法的比较研究〔J〕. 青岛农业大学学报（自然科学版），2010，27(2)：122－125.〔Tian Wei，Tian Yike，Wang Caihong，et al. Comparison of methods for total RNA extraction from apple tissues〔J〕. Journal of Qingdao Agricultural University（Natural Science Edition），2010，27(2)：122－125.〕

〔13〕 杜凡. 苹果冷胁迫下差异表达基因的筛选及新抗逆基因*MdTLP7*的功能鉴定〔D〕. 泰安：山东农业大学，2014.〔Du Fan. Identification of Differential Expression Genes under Cold Stress in Apple and Function Identification of a Novel Anti-Stress Gene *MdTLP7*〔D〕. Tai'an：Shandong Agricultural University，2014.〕

〔14〕 Chang S，Puryear J，Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees〔J〕. Plant Molecular Biology Reporter，1993，59(11)：113－116.

〔15〕 宋成秀，张利义，张彩霞，等. 适合转录组测序的苹果果实RNA提取方法的筛选〔J〕. 中国果树，2015，2(23)：47－49.〔Song Chengxiu，Zhang Liyi，Zhang Caixia，et al. Screening of RNA extraction methods suitable for transcriptome sequencing of apple fruit〔J〕. China Fruits，2015，2(23)：47－49.〕

〔16〕 Li M，Li D，Feng F，et al. Proteomic analysis reveals dynamic regulation of fruit development and sugar and acid accumulation in apple〔J〕. Journal of Experimental Botany，2016，67(17)：5 145－

5 157.

〔17〕李冬霞. 苹果果糖积累相关基因 MdTSTl 和 MdFK2 启动子功能鉴定及其转录因子筛选〔D〕. 杨凌:西北农林科技大学,2016.〔Li Dongxia. Functional Identification of Fructose Accumulation Related Genes MdTSTl and MdFK2 Promoter and Screening of Transcription Factors in Apple Fruit〔D〕. Yangling:Northwest Agriculture and Forestry University,2016.〕

〔18〕张晶. 功能型苹果类黄酮合成相关基因表达分析及果实性状比较〔D〕. 泰安:山东农业大学,2014.〔Zhang Jing. Functional Expression Analysis of Flavonoid Synthesis Related Genes and Comparison of Fruit Characters in functional apple〔D〕. Tai'an:Shandong Agricultural University,2014.〕

〔19〕闫述模,袁媛,杨滨,等. 一种适用于不同发育期山楂果实总 RNA 提取的方法〔J〕. 中国实验方剂学杂志,2016,22(14):39－43.〔Yan Shumo,Yuan Yuan,Yang Bin,et al. Good method for isolating total RNA from crataegi fructus at different developmental stages〔J〕. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae,2016,22(14):39－43.〕

〔20〕马川. 苹果、枣花孕育相关基因的克隆和功能表达研究〔D〕. 保定:河北农业大学,2010.〔Ma Chuan. Cloning and Functional Expression Analysis of Genes Related to Flower Initiation in Apple and Chinese Jujube Floral Bud〔D〕. Baoding:Agricultural University of Hebei,2010.〕

〔21〕谭才邓,李静,邓毛程. 神秘果果实总 RNA 提取方法比较研究〔J〕. 基因组学与应用生物学,2013,32(3):409－412.〔Tan Caideng,Li Jing,Deng Maocheng. Study on total RNA extraction methods from miracle fruit〔J〕. Genomics and Applied Biology,2013,32(3):409－412.〕

〔22〕耿雪青. 苹果果实 cDNA 文库的构建〔D〕. 北京:中国农业大学,2003.〔Geng Xueqing. Constructing cDNA Library of Apple Fruits〔D〕. Beijing:China Agricultural University,2003.〕

〔23〕陈弟,符贤英,殷晓敏,等. 几种果实总 RNA 提取方法的评价〔J〕. 广东农业科学,2007,11(17):30－33.〔Chen Di,Fu Xianying,Yin Xiaomin,et al. Assessment of several extraction methods of total RNA from fruits〔J〕. Guangdong Agricultural Sciences,2007,11(17):30－33.〕

Choosing of Methods for Total RNA Extraction from *Malus sieversii* Fruits in Xinjiang

XIA Chun-lan[1,2,3], WEN Zhi-bin[1], ZHANG Yu-fang[1]

(1. *Key Laboratory of Biogeography and Biological Resources under Chinese Academy of Sciences*, *Xinjiang institute of Ecology and Geography*, *Chinese Academy of Sciences*, *Urumqi* 830011, *Xinjiang*, *China*;

2. *University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 101408, *China*;

3. *College of Life Science*, *Shihezi University*, *Shihezi* 832000, *Xinjiang*, *China*)

Abstract: *Malus sieversii* fruits are rich in polysaccharides, polyphenols, soluble pectin and other secondary metabolites. Therefore, it is relatively difficult to extract the total RNA from *M. sieversii* fruits. In order to choose an effective extraction method, five RNA extraction methods including the TaKaRa Kit, Trans Kit, improved CTAB method by Tian Wei, modified CTAB method I and CTAB method Ⅱ were compared using the fruits at five different developmental stages. Results showed that neither kits method was able to be used to extract the RNA from *M. sieversii* fruits. The quality of total RNA extracted with three modified CTAB methods was good, with two distinct electrophoresis bands of 28S and 18S rRNA, the OD_{260}/OD_{280} values ranged from 1.8 to 2.2, and the OD_{260}/OD_{230} value was higher than 2.0. But only the modified CTAB method I was an effective method to yield high quantity of total RNA. The average extraction values of fruits at five different developmental stages were ranged from 116.79 $\mu g \cdot g^{-1}$ to 474.76 $\mu g \cdot g^{-1}$. For the modified CTAB method I, the impurity in the RNA was effectively removed by extending LiCl precipitation time and placing extraction under 4 ℃ for overnight aging (not longer than 16 hours) instead of −20 ℃ for 15 min. Although this method took 2 days, the method was easy to operate, and the extraction cost was low. Therefore, the modified CTAB method I is an effective method for total RNA extraction from *M. sieversii* fruits (especially for the ripe fruits), which could be used in further molecular biology research.

Key words: *Malus sieversii Roeml*; total RNA; extraction method; improved CTAB method